

Les peptide-synthétases

Des enzymes modulaires multifonctionnelles

Sylvie Rebuffat, Jean Péduzzi et Grégory Leclerc

Summary Peptide synthetases, multifunctional modular enzymes

Many peptides of bacterial and fungal origin are synthesized non-ribosomally on large multifunctional proteins termed peptide synthetases. These enzymes contain repetitive units (modules), in which several catalytic domains perform specific reactions of peptide synthesis: amino acid monomers are activated by the adenylation domains and loaded onto the adjacent domains as thioesters, then the formation of peptide bonds and translocation of the growing chain are effected on the synthetase by the condensation domains. Significant progress has been made towards understanding the modular structure of these multifunctional enzymes, the catalytic mechanisms and the substrate specificity. The number and order of the modules within the synthetases determine the sequence of the peptide products. These advances enable the rational construction of hybrid genes encoding new functional peptide synthetases with specifically altered substrate specificity, allowing a new strategy for the design and development of novel drugs.

Mots-clés Peptide-synthétase, biosynthèse peptidique non ribosomale, peptides bioactifs, enzymes modulaires multifonctionnelles.

Key-words Peptide synthetase, non-ribosomal peptide biosynthesis, bioactive peptides, multifunctional modular enzymes.

La majorité des peptides bioactifs (antibiotiques, antiviraux, antitumoraux, immunosuppresseurs...) produits par des micro-organismes n'est pas biosynthétisée par la voie ribosomale, voie classique de biosynthèse des protéines. Ils résultent d'une voie enzymatique présentant une forte analogie avec la biosynthèse d'autres métabolites secondaires, comme les acides gras et les polyacétates. Le modèle initial proposé par Lipmann [1] a été progressivement affiné durant les dix dernières années [2]. Les réactions impliquées dans l'assemblage séquentiel des acides aminés sont réalisées par des enzymes modulaires multifonctionnelles nommées peptide-synthétases. Les peptides obtenus renferment fréquemment des acides aminés non-protéinogènes (acides aminés de la série D, α,α -dialkylés, *N*-méthylés...); les modifications mises en jeu peuvent être effectuées par ces enzymes.

études traitant de la biosynthèse du tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-cystéinyl-D-valine (ACV) [5], précurseur des pénicillines et des céphalosporines.

Les peptides produits par les bactéries ne requièrent pas forcément une seule peptide-synthétase, tandis que ceux synthétisés par des champignons microscopiques résultent d'une seule enzyme. Chaque synthétase est formée d'une seule chaîne polypeptidique dont la taille varie de 51 kDa (actinomycine D-synthétase 1) à 1 689 kDa pour la cyclosporine A (CsaA)-synthétase [6, 8]. Actuellement, plusieurs opérons (unité d'expression et de régulation génétique comportant les gènes de structure et les éléments de contrôle) d'origine bactérienne et quelques gènes d'origine fongique codant pour des peptide-synthétases ont été clonés et séquencés (tableau I). Long de 45 kilobases,

Les peptide-synthétases : mécanisme de biosynthèse peptidique

Les données aujourd'hui disponibles sur ce mécanisme et les enzymes impliquées, pour lesquelles l'intérêt ne cesse de grandir, résultent principalement des travaux menés sur deux antibiotiques cycliques d'origine bactérienne, la gramicidine S (Grs) [3] et la tyrocidine A (Tyc) [4], et des

Tableau I - Sélection de peptides d'origine bactérienne et fongique biosynthétisés de façon non-ribosomale.

Peptide	Propriétés	Organisme	Opérons	Enzyme	Taille (kDa)
Gramicidine S [3]	antibactérien, tensio-actif chélatant de nucléotides	<i>Bacillus brevis</i>	<i>grs</i>	Grs 1	127
				Grs 2	509
Tyrocidine A [4]	antibactérien antibiotique local hémolytique	<i>Bacillus brevis</i>	<i>tyc</i>	Tyc 1	123
				Tyc 2	405
				Tyc 3	724
Actinomycine [6]	antibactérien antitumoral	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	<i>acm</i>	ACMS I	51
				ACMS II	284
				ACMS III	462
Surfactine A [7]	antimycobactérien tensio-actif chélatant de nucléotides	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>srf A</i>	SrfA-A	402
				SrfA-B	401
				SrfA-C	144
ACV [5]	précurseur des β -lactamines (pénicillines, céphalosporines)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>acv A</i>	ACVS	421
Cyclosporine A [8]	immunosuppresseur	<i>Tolypocladium niveum</i>	<i>css A</i>	Csa A	1689

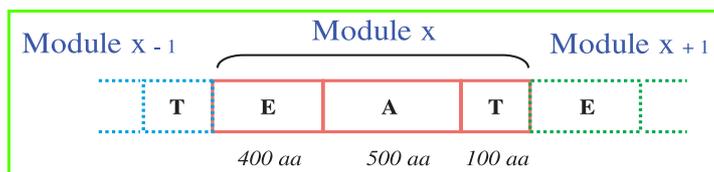


Figure 1 - Organisation des différents domaines catalytiques spécialisés dans l'adénylation du substrat (A), la formation de thioester (T) et l'élongation de la chaîne peptidique (E).

le gène *cssA* codant pour la CssA-synthétase qui comporte plus de 15 000 acides aminés est l'un des plus grands gènes connus.

Arrangement modulaire des peptide-synthétases

L'analyse de la structure primaire des peptide-synthétases a montré que ces enzymes sont composées de modules de 1 000 à 1 400 acides aminés (figure 1). Chaque module catalyse l'activation et la condensation d'un des acides aminés du peptide à produire, et dans certains cas la modification de ce résidu. L'identité et l'ordre dans lesquels se trouvent les modules déterminent la séquence du peptide qui est synthétisé de l'extrémité N- vers l'extrémité C-terminale.

Chaque module est subdivisé en plusieurs domaines fonctionnels [2, 9] : un domaine d'élongation (E) situé en début de module, responsable de la formation des liaisons peptidiques, un domaine d'adénylation (A) et un domaine de thioestérification (T) (figure 1). La peptide-synthétase peut présenter un domaine thioestérase localisé à l'extrémité C-terminale du dernier module, responsable de la terminaison de la chaîne peptidique. On trouve également des domaines de racémisation, de N-méthylation, et plus rarement des domaines à activité réductase ou de cyclisation responsables de la formation d'hétérocycles [9-10].

Réactions chimiques catalysées par les peptide-synthétases

Adénylation

Le domaine A est une région importante qui gouverne à la fois la reconnaissance de l'ATP et d'un acide aminé, conduisant à l'activation de ce dernier en aminoacyladénylate (figure 2). Il est analogue au domaine catalytique rencontré chez les luciférases et les acyl-CoA-synthétases [3]. Le mécanisme d'activation consiste en une attaque nucléophile du

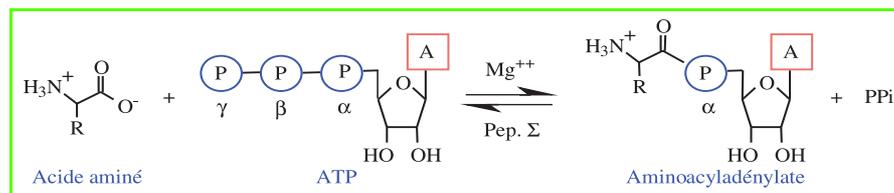


Figure 2 - Mécanisme d'adénylation du substrat impliquant la peptide-synthétase (Pep. Σ), l'ATP, un acide aminé, et conduisant à la formation d'un aminoacyladénylate et à la libération de PPi (phosphate inorganique).

groupement carboxyle de l'acide aminé sur le phosphate α de l'ATP conduisant à la libération de pyrophosphate et à la formation d'un aminoacyladénylate très réactif [4].

Thioestérification

Le second domaine fonctionnel est le domaine de thioestérification. Il est également désigné sous le nom de protéine-transporteur de groupement peptidyle (PTP), par analogie avec la protéine-transporteur de groupement acyle (PTA) rencontrée chez les synthétases d'acides gras. Comme pour les PTA, le domaine PTP est le site de fixation du cofacteur 4'-phosphopantéthine (4'-PP). Après la phase d'adénylation, l'acidoacyladénylate est transféré sur le groupement cystéamine terminal du cofacteur 4'-PP, formant un thioester lié à l'enzyme via la libération d'AMP (figure 3) [11].

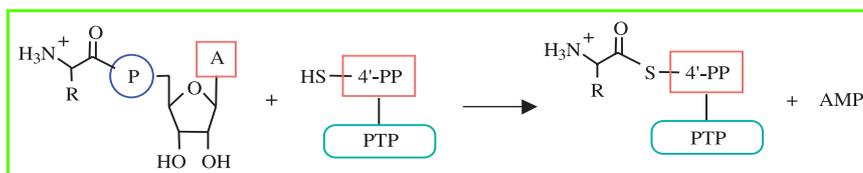


Figure 3 - Mécanisme de thioestérification impliquant l'acidoacyladénylate et le groupement cystéamine (SH) du cofacteur 4'-phosphopantéthine (4'-PP) fixé sur la protéine-transporteur de groupement peptidyle (PTP).

Élongation

Contrairement aux domaines A et T, peu de données concernent le domaine E. Les informations sur les séquences de peptide-synthétases montrent que ce domaine est situé en amont du domaine A [9]. La comparaison des séquences a permis d'identifier un motif conservé nommé HIS [12]. Ce motif contient un résidu histidine qui déprotonerait le groupement NH_2 de l'acide aminé à incorporer, facilitant l'attaque nucléophile sur le carbonyle activé du peptide en cours d'élongation lié au cofacteur 4'-PP (figure 4).

Terminaison : domaine thioestérase

La terminaison de la synthèse peptidique consiste à rompre la liaison thioester qui lie le peptide à l'enzyme. Elle peut se réaliser de plusieurs façons : par hydrolyse du thioester (production d'un peptide linéaire), par cyclisation avec le groupement NH_2 d'une chaîne latérale (peptide ramifié) ou de l'acide aminé N-terminal (peptide cyclique), par lactonisation avec un groupement OH terminal ou de chaîne latérale (formation d'une lactone ou d'une lactone ramifiée).

Le mécanisme de terminaison reste encore mal connu. Une région d'environ 250 acides aminés située en partie C-terminale, en aval du dernier module d'activation, possède des homologies avec les thioestérases [3]. Il est dès lors tentant d'assimiler le rôle de cette région, appelée domaine thioestérase, au clivage du peptide mature en raison de sa localisation. Ce mécanisme explique la production de peptides linéaires. Selon une autre hypothèse [9], le domaine thioestérase pourrait avoir la fonction d'acyltransférase, ces deux familles d'enzymes partageant le même centre catalytique. Les cyclisations ou les ramifications seraient alors le résultat d'un

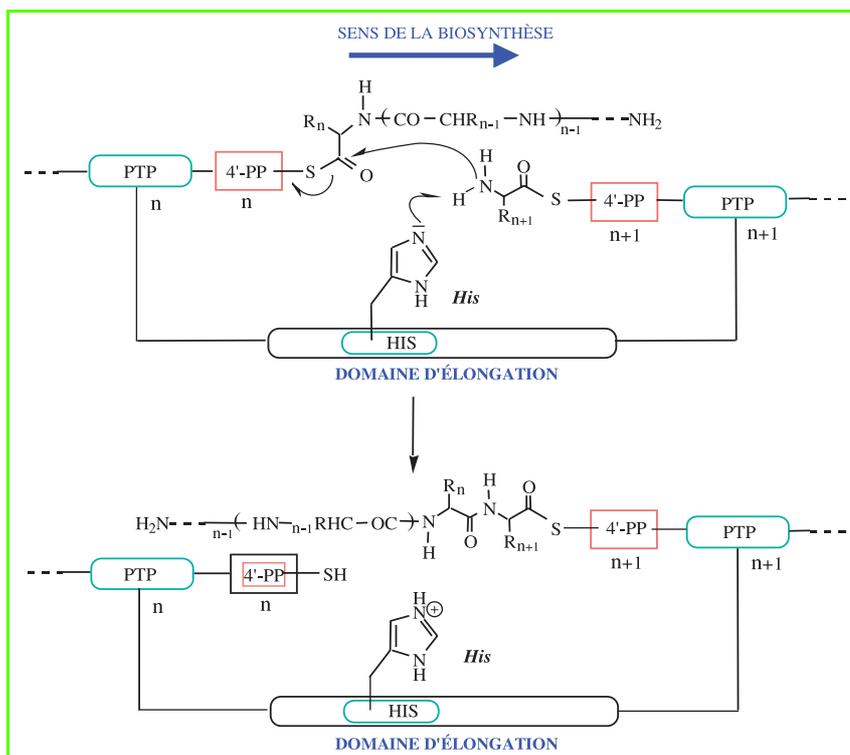


Figure 4 - Mécanisme proposé pour l'élongation de la chaîne peptidique impliquant une histidine du motif HIS inclus dans le domaine d'élongation, qui catalyse une attaque nucléophile de l'amine du résidu n+1 sur le carbonyle activé du résidu n [12]. PTP : protéine-transporteur de groupement peptidyle, 4'-PP : 4'-phosphopantéthéine.

transfert intramolécule d'un groupement acyle de la chaîne peptidique linéaire.

Purification et caractérisation de peptide-synthétases

La purification de peptide-synthétases d'origine bactérienne paraît, de façon générale, poser moins de problèmes techniques que celle des enzymes d'origine fongique. Ceci peut s'expliquer par les différences de caractéristiques cellulaires entre bactéries et moisissures, et par des masses moléculaires souvent plus élevées pour les enzymes d'origine fongique (tableau I). Entre 1987 et 1997, plusieurs peptide-synthétases provenant de bactéries ont été purifiées à homogénéité comme celles de *Bacillus brevis* produisant la gramicidine S et la tyrocidine A [3-4], celle de *Streptomyces chrysomallus* synthétisant l'actinomycine D [6] ou encore la pristinamycine-synthétase de *Streptomyces pristinaespiralis* [13]. Pendant cette même période, seules les ACV- et CsaA-synthétases d'origine fongique ont été purifiées respectivement à partir de *Penicillium chrysogenum* et *Tolypocladium inflatum* [5, 8]. Dans ce même domaine, notre groupe a récemment purifié, à partir du champignon filamenteux *Trichoderma longibrachiatum*, la peptide-synthétase responsable de la biosynthèse des longibrachines, peptaïbols de 20 résidus [14]. Ces peptides antibiotiques linéaires renferment une forte proportion de résidus acide α -amino-isobutyrique (Aib). Cette enzyme monomérique est caractérisée par un point isoélectrique de 5,5 et une masse moléculaire de 1920 kDa déterminée par ultracentrifugation analytique [15]. Elle constitue ainsi la peptide-synthétase de plus haute masse moléculaire isolée et caractérisée jusqu'à présent.

Intérêt biotechnologique des peptide-synthétases

L'organisation des peptide-synthétases en régions fonctionnelles séparées suggère la possibilité de modifier génétiquement l'ordre et le type de modules de façon à construire de nouvelles enzymes capables de produire des peptides originaux contenant éventuellement des acides aminés non-protéinogènes [9]. Cette approche représente une méthode de synthèse peptidique *in vivo*, ouvrant une voie vers la conception de nouveaux peptides bioactifs.

Dans cette perspective, les domaines A de différentes synthétases ont été échangés pour générer des enzymes hybrides capables de produire de nouveaux peptides. Ainsi, le remplacement du dernier domaine A de la surfactine-synthétase par un domaine A de la Grs-synthétase ou de l'ACV-synthétase a été réalisé [7]. Les peptides produits par la synthétase modifiée génétiquement portent en position C-terminale l'acide aminé reconnu par le nouveau domaine introduit dans le gène.

L'exploitation de la région thioestérase responsable de la libération du peptide synthétisé par l'enzyme a été également envisagée [16]. La surfactine-synthétase a ainsi été modifiée génétiquement en déplaçant la région thioestérase terminale à la fin d'un domaine interne d'activation, de façon à générer des peptides tronqués de séquences prédéterminées. Ces résultats montrent la possibilité d'obtenir ainsi des peptides de tailles et caractéristiques différentes.

Par ailleurs, les fortes similarités entre peptide-synthétases et polycétide-synthases, tant au niveau de leur structure modulaire que de leur fonctionnement, ont suscité l'idée de combiner des modules appartenant à ces deux types d'enzymes multifonctionnelles [17]. Cette approche de biosynthèse combinatoire s'avère prometteuse pour produire de nouveaux composés hybrides peptide/polycétide.

Conclusion

Malgré les progrès rapides et croissants concernant les caractéristiques structurales et l'agencement modulaire des peptide-synthétases, de très nombreuses questions persistent encore dans ce domaine. En particulier, les données structurales sur les enzymes d'origine fongique sont presque inexistantes, la purification de ces synthétases s'avérant très délicate. Cependant, les développements de la biosynthèse combinatoire, utilisant soit des modules appartenant à différentes peptide-synthétases, soit des modules de peptide-synthétase et de polycétide-synthase, s'avèrent prometteurs pour la conception de nouvelles molécules.

Enfin, un dernier intérêt de ces peptide-synthétases concerne la place qu'elles occupent au cours de l'évolution des micro-organismes. En effet, la majorité des peptides bioactifs résulte, à de rares exceptions près, de la voie polyenzymatique non ribosomale. La question se pose dès lors de savoir quel bénéfice peuvent retirer les

micro-organismes d'une telle voie de biosynthèse, grande consommatrice d'énergie et peu spécifique. Cependant, la discrimination entre plusieurs acides aminés structuralement proches et donc la spécificité du système ribosomal ne tiennent pas tant à la sélectivité de l'aminocyl-ARNt-synthétase qu'à la présence d'un certain nombre de mécanismes de sauvegarde empêchant ou réparant les erreurs de traduction. Si l'on prend en compte tous ces mécanismes, il apparaît alors que le coût énergétique pour la cellule est sensiblement équivalent pour les deux voies de biosynthèse [18]. Quant à la faible spécificité attribuée à ces systèmes enzymatiques, des travaux récents [19] tendent à montrer que des règles orienteraient la reconnaissance, par le domaine d'adénylation, des acides aminés substrats.

Références

- [1] Lipmann F., *Science*, **1971**, 173, p. 875.
 [2] Von Döhren H., Keller U., Vater J., Zocher R., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, p. 2675.
 [3] Turgay K., Krause M., Marahiel M.A., *Mol. Microbiol.*, **1992**, 6, p. 529.
 [4] Dieckmann R., Pavela-Vrancic M., Pfeifer E., Von Döhren H., Kleinkauf H., *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 247, p. 1074.
 [5] Byford M.F., Baldwin J.E., Shiau C.Y., Schofield C.J., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, p. 2631.
 [6] Pfennig F., Schauwecker F., Keller U., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, p. 12508.
 [7] Stachelhaus T., Schneider A., Marahiel M.A., *Science*, **1995**, 269, p. 69.
 [8] Weber G., Schörgendorfer K., Schneider-Scherzer E., Leitner E., *Curr. Genet.*, **1994**, 26, p. 120.
 [9] Marahiel M.A., Stachelhaus T., Mootz H.D., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, p. 2651.
 [10] Konz D., Marahiel M.A., *Chem. Biol.*, **1999**, 6, p. R39.
 [11] Stein T., Vater J., Kruft V., Otto A., Wittmann-Liebold B., Franke P., Panico M., Mc Dowell R., Morris H.R., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, p. 15428.
 [12] De Crécy-Lagard V., Marlière P., Saurin W., *C.R. Acad. Sci. Paris/Life Sci.*, **1995**, 318, p. 927.
 [13] Thibaut D., Bisch D., Ratet N., Maton L., Couder M., Debussche L., Blanche F., *J. Bacteriol.*, **1997**, 179, p. 697.
 [14] Leclerc G., Rebuffat S., Péduzzi J., Goulard C., Barthélémy M., Bodo B., Bajusz, F. Hudecz, éd., *Akademiai Kiado Budapest (Hongrie)*, **1999**, p. 142.
 [15] Leclerc G., Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), **2000**.
 [16] De Ferra F., Rodriguez F., Tortora O., Tosi C., Grandi G., *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, p. 25304.
 [17] Du L., Shen B., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **2001**, 4, p. 215.
 [18] Trauger J.W., Walsh C.T., *Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis*, **2000**, 97, p. 3112.
 [19] Von Döhren H., Dieckmann R., Pavela-Vrancic M., *Chem. Biol.*, **1999**, 6, p. R273.



S. Rebuffat

Sylvie Rebuffat

est professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle*.

Jean Péduzzi

est chargé de recherche CNRS*.

Grégory Leclerc

est chercheur à l'Institut de Recherche Servier**.



G. Leclerc



J. Péduzzi

* Laboratoire de chimie des substances naturelles, ESA 8041 CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, 63 rue Buffon, 75005 Paris.

Tél. : 01 40 79 31 18. Fax : 01 40 79 31 35.

E-mails : rebuffat@mnhn.fr ; peduzzi@mnhn.fr

** Institut de Recherche Servier, 125 chemin de Ronde, 78290 Croissy-sur-Seine.

Tél. : 01 55 72 28 18.

E-mail : gregory.leclerc@fr.netgrs.com